

PRIORITY DOCUMENT

Bescheinigung

Die DIAGEN Institut für molekularbiologische Diagnostik GmbH in 4010 Hilden hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren und Vorrichtung zur Bewertung der Fitness von Biopolymeren"

am 18. Januar 1993 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole G 01 N 21/64, G 01 N 33/68, G 02 B 21/16, C 12 Q 1/00 und C 07 K 3/22 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 1. Februar 1994
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

en: P 43 01 005.9

R. Konvalin



Verfahren und Vorrichtung zur Be-
wertung der Fitness von Biopolymeren

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von einem oder wenigen Molekülen, insbesondere in einer Verdünnung von ≤ 10 nM unter Verwendung der laserangeregten Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie, die Verwendung des Verfahrens für bestimmte Anwendungen, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die Analytik von biologisch aktiven Molekülen wurde in den letzten Jahren bezüglich Spezifität und Sensitivität ständig verbessert und durch grundsätzlich neue Techniken ergänzt. In diesem Zusammenhang sei auf Klonierungsmethoden oder die Methoden der enzymatischen Amplifikation genetischen Materials verwiesen, um einzelne Zellen oder Moleküle zahlenmäßig so zu verstärken, daß sie einer konventionellen Analyse zugänglich werden. Es ist aber in vielen Fällen vorteilhafter, wenn die Sensitivität eines Analysenverfahrens hinreichend wäre, um einzelne Moleküle oder Ensembles mit wenigen Molekülen direkt qualitativ und quantitativ zu erfassen. Die Elektronenmikroskopie ist beispielsweise ein Verfahren, mit dem einzelne Moleküle erfaßt werden können. So wird versucht, mit der Tunnelelektronenmikroskopie einzelne DNA-Moleküle zu sequenzieren. Dies ist jedoch sehr aufwendig.

Über die reine Analytik einzelner Moleküle hinaus sind für viele Bereiche Aussagen über Zustandsparameter der Moleküle wichtig wie deren Konformation und Wechselwirkung mit molekularen Strukturen.

Moderne Methoden der evolutiven Biotechnologie befassen sich mit hochkomplexen Kollektiven von Molekülen. Es gilt dabei, Moleküle mit spezifischen Wechselwirkungseigenschaften gegenüber Zielstrukturen zu identifizieren, das heißt, eine bestimmte Fitness bezüglich einer erwünschten Funktion zu messen. Eine solche Fitness kann sich auf thermodynamische Parameter wie Bindungskonstanten bzw. Geschwindigkeitskonstanten zurückführen lassen. Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe besteht somit unter anderem darin, ein Verfahren anzugeben, daß es erlaubt, über die reine Detektion einzelner Moleküle hinaus, Informationen über ihre spezifischen Wechselwirkung mit anderen Molekülen zu erhalten.

Für eine Anzahl wichtiger Problemstellungen ist es weniger entscheidend, die Sensitivität einer Methode aufgrund einer limitierten Verfügbarkeit des zu analysierenden Moleküls zu steigern, als vielmehr die Tatsache, daß es eine sehr große Zahl von Proben gibt, die mehr oder weniger zeitgleich analysiert werden müssen. Wenn innerhalb eines Zeitraumes von Stunden z.B. 106 Analysen durchzuführen sind, ist es offensichtlich, daß nur ein Analyseverfahren infragekommen kann, dessen Proben in einem Zeitintervall von ca. 1 ms bis maximal 1 s vermessen und ausgewertet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf einer Lumineszenzdetektion und nutzt eine Methode, die als Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) an sich bekannt ist. Chromophore Molekülstrukturen mit Fluoreszenz-

eigenschaften lassen sich nutzen, um Aussagen über die molekulare Umgebung eines chromophoren Liganden zu erhalten. Es lassen sich Rotationsdiffusion und Translationsdiffusion eines Luminophors messen, sowie verschiedene Wege der Energieübertragung auf wechselwirkende Moleküle, chemische Kinetik und die Lebensdauer angeregter Zustände.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet auf der Basis an sich bekannter physikalisch chemischer Phänomene neue Problemlösungen, um an einzelnen oder wenigen Molekülen unter Ausnutzung spektroskopischer Meßparameter Aussagen über die Natur der Moleküle zu erhalten, sowie Aussagen über ihre Fitness bezüglich einer bestimmten Wechselwirkungsfunktion oder über den Besetzungsgrad verschiedener molekular definierter Zustände eines Luminophors.

Das Verfahren der Korrelationsfluoreszenz-Spektroskopie, wie es von den Gruppen D. Magde (Elson, E.L. & Magde, D. (1974) Fluorescence correlation spectroscopy. Conceptual basis and theory. Biopolymers 13, 1-27) und R. Rigler (Ehrenberg, M & Rigler, R. (1974) Rotational Brownian motion and fluorescence intensity fluctuations. Chem. Phys. 4, 390 - 401) seit fast zwanzig Jahren verfolgt wurde, konnte technisch bislang nicht ohne weiteres in ein praktikables Analyseverfahren umgesetzt werden. Es war nicht möglich, den oben genannten Anforderungen bzgl. Meßzeiten und der Problematik der Licht-induzierten Ausbleichung (Photobleaching) der Farbstoffe gerecht zu werden. Rigler et al. konnten Rotationszeiten von Molekülen bestimmen. Magde et al. konnten einige chemische Reaktionskonstanten über Fluktuationszeiten bestimmen.

Das Meßprinzip der CFS beruht darin, daß fluorophore Moleküle in äußerst verdünnten Lösungen gemessen werden

($\leq 10\text{ nM}$), indem ein relativ kleines Volumenelement der Lösung einem starken Anregungslicht eines Laser ausgesetzt wird. Nur die Moleküle entsprechenden Anregungsspektrums, die sich in eben diesem Volumen aufhalten, werden durch das Licht angeregt. Die emittierte Fluoreszenz aus diesem Volumenelement kann dann auf einen Photomultiplier hoher Sensitivität abgebildet werden. Handelt es sich um verdünnte Lösungen, so ergeben sich nennenswerte Schwankungen der Konzentration der sich in dem jeweiligen Volumenelement befindlichen Moleküle. Bei sehr verdünnten Lösungen ergibt sich eine Poisson-Verteilung der Zahl der gleichzeitig in dem Volumenelement vorhandenen Moleküle pro Zeitintervall. Ein Molekül, daß einmal in das Volumenelement eindiffundiert ist, wird sich gemäß seiner Diffusionsgeschwindigkeit der Translation in einer durchschnittlichen, aber für das betreffende Molekül charakteristischen Zeit wieder aus dem Volumenelement entfernen und somit nicht mehr zu beobachten sein. Wenn nun ein und dasselbe Molekül während seiner durchschnittlichen Aufenthaltsdauer in dem entsprechenden Beobachtungselement viele Male optisch angeregt werden kann, lassen sich von diesem Molekül viele Fluoreszenzsignale erfassen. Mit anderen Worten, die Wahrscheinlichkeit, daß ein einmal eindiffundiertes Molekül vor seinem Wiederaustritt aus dem Volumenelement nochmals angeregt werden kann, ist bei verdünnten Lösungen viel größer, als das Signal, das von einem neueintretenden Molekül ausgesandt werden kann. Somit läßt sich eine Korrelation der zeitlichen Veränderung der auflaufenden Emissionssignale mit den relativen Diffusionszeiten der beteiligten Molekülspezies erstellen. Wird die Drehung der Polarisationssebene von Anregungslicht und emittiertem Licht als ein weiterer Parameter gemessen, so läßt sich auch der Rotationsdiffusionskoeffizient der beteiligten Moleküle bestimmen, aus denen Aufschlüsse über

Molekulargewicht, Formparameter oder die umgebende Matrix gewonnen werden können.

Es wird ersichtlich, daß es theoretisch möglich ist, Einzelmoleküle in verdünnten Lösungen dadurch zu erfassen, daß ein und dasselbe Molekül mehrtausendfach angeregt wird und das entsprechende Fluoreszenzlicht in vielen Einzelmessungen akkumuliert wird.

Der Umsetzung dieses Meßprinzips in die Praxis standen viele technische Schwierigkeiten entgegen. Das Beobachtungselement war trotz des Einsatzes moderner Lasertechnologie so groß, daß sich biologisch interessante Biomoleküle mit niedrigen Translationsdiffusionskoeffizienten in einer Größenordnung von etwa 50 ms im Beobachtungselement aufhielten. Diese Zeit ist erheblich zu lange, denn sie bedingt ein starkes Ausbleichen der jeweils eingesetzten Farbstoffliganden. Häufige Lichtanregung erhöht die chemische Reaktivität der chromophoren Struktur mit Molekülen der Umgebung, insbesondere mit Sauerstoff, wodurch die Fluoreszenzaktivität verändert oder gelöscht wird. Natürlich führt diese Ausbleichung (Photobleaching) direkt zu falschen Meßdaten, da ein Verlust der Fluoreszenz den Austritt des Moleküls aus dem Meßelement vortäuscht und eine Unterscheidung durch Standardisierung der Meßmethode kaum möglich ist oder sich nur durch unverhältnismäßig großen Aufwand erzielen läßt.

Somit war der breiten praktischen Umsetzung des Meßprinzips in ein allgemeinanwendbares Verfahren bislang enge Grenzen gesetzt, die durch das erfindungsgemäße Verfahren jedoch überwunden werden.

Der entscheidende Durchbruch auf dem Weg zu einem Routineverfahren für die oben definierten Aufgabenstellungen der CFS wird erfindungsgemäß durch die Einführung ultrakleiner Meßvolumina (10^{-14} - 10^{-17} l) bei Probengesamtvolumina im μ l-Bereich erreicht, deren Realisierung den gleichzeitigen erfindungsgemäßen Einsatz bestimmter Elemente der Anregungsoptik, der Einzelphotonenregistrierung und der Probenhandhabung voraussetzt. Das Meßvolumen der in den experimentellen Anordnungen beschriebenen Vorrichtung ist mit 2×10^{-16} l ca. 1000fach kleiner als die in der Literatur beschriebenen Meßvolumina. Die ausgeleuchtete Fläche hat somit in etwa die Dimension von $0,1 \mu\text{m}^2$. Legt man die Annahme zugrunde, daß die CFS besonders korrekte Daten für eine Konzentration chromophorer Moleküle von $0,1$ - 10 Moleküle pro Volumenmeßelement liefert, so ist die Arbeitskonzentration ca. 10^{-7} - 10^{-9} M. Technisch wurden Messungen mit maximaler Detektionseffizienz und Hintergrunddiskriminierung durch Verwendung einer konfokalen Optik hoher Apertur in Kombination mit Einzelphotonendetektion möglich.

Bindungskonstanten können dann über die Translationsdiffusion bestimmt werden, wenn die Reaktionszeit langsam gegenüber der Diffusionszeit ist, das heißt ein zu beobachtender Ligand während seines Eintrittes in das Meßkompartiment und seinem Austritt nicht seine molekulare Struktur verändert. Ansonsten wird nur eine Korrelation gemessen, die den gemischten Zustand beschreibt. Hier wird wiederum die Bedeutung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit sehr kleinen Meßvolumina deutlich, da die Verweilzeit eines Moleküls ca. 1000-fach kleiner ist als in den bisherigen Kompartimenten und somit die üblichen Dimensionen für Gleichgewichtskonstanten und Geschwindigkeitskonstanten spezifischer, biologischer Erkennungs-

reaktionen, z. B. Ligand/Rezeptor-Wechselwirkung, für eine Messung erschließt.

Bei niedrigeren Konzentrationen müssen entsprechend mehr Volumenelemente einer Meßung unterzogen werden. Da die durchschnittliche Meßdauer für eine Messung je nach erforderlicher Qualität der Meßdaten (Signal/Rauschverhältnis) zwischen 10 und 100ms beträgt, lassen sich in 1000 s 10.000 bis 100.000 Volumenelemente überprüfen. Somit lassen sich extrem niedrige Konzentrationen von 10^{-14} bis 10^{-15} M vermessen. Das bedeutet auch, daß sich spezifische biologische Wechselwirkungen mit Bindungskonstanten $K_{\text{ass}} \geq 10^6$ mol/l bis zu $K_{\text{ass}} = 10^{15}$ mol/l messen lassen.

In einem Beispiel wird dargestellt, wie sich Bindungskonstanten oder Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten mit der erfindungsgemäßen Technik bestimmen lassen. Die erfindungsgemäße Messung eines Bindungsgleichgewichtes zwischen Reaktanden wird gemessen, indem mindestens ein Reaktand mit mindestens einem Farbstoffmolekül vorzugsweise chemisch gekoppelt ist, und sich die Rotationsdiffusionsgeschwindigkeit und/oder die Translationsdiffusionsgeschwindigkeit des Reaktanden durch die Komplexbindung ändert. Wenn sich Gleichgewichtskonstanten experimentell nicht direkt mit der Bedingung hochverdünnter Lösungen in Übereinstimmung bringen lassen, das heißt, wenn niedrige Bindungskonstanten höhere Konzentrationen an Reaktanden erfordern, läßt sich dies entweder z.B. dadurch erreichen, daß der nicht-markierte Reaktionspartner im Überschuß angeboten wird, oder indem die markierte Verbindung einem Überschuß an unmarkiertem Reaktanden zugesetzt wird.

Die Messung einer Reaktionskinetik über molekulare Fluktuation mit CFS, wie sie von Magne beschrieben worden

ist, ließ sich wegen der langen Diffusionswege in den bisher realisierten Meßkompartimenten nicht befriedigend lösen. Mit der erfindungsgemäßen Meßtechnik ist die Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten eines Komplexes in einem Bereich von 10^{-6} s^{-1} bis zu etwa 10^3 s^{-1} möglich, ein Bereich, der für biochemische Reaktionen relevant ist. Die Messung kann z.B. durch den Austausch von fluoreszenzmarkierten Tracermolekülen bestimmt werden.

4. Die erfindungsgemäße Technik erlaubt auch die Messung von Konformationsänderungen biologischer Makromoleküle, die Bestimmung thermodynamischer und kinetischer Konstanten. Fluktuationen der Struktur lassen sich z.B. über die Messung der Rotationsdiffusion oder über Signaländerungen durch sog. energy-transfer (Förster Transfer) erfassen.

Die Methode ist auch für die DNA/RNA Analytik anwendbar. In der genetischen Analytik, insbesondere zur Bestimmung von infektiösen Erregern ist die Sensitivität des diagnostischen Verfahrens oft von ausschlaggebender Bedeutung. Dies wurde gerade in den letzten Jahren in Zusammenhang mit der Einführung enzymatischer Methoden zur Amplifikation genetischer Zielsequenzen deutlich. Durch den Einsatz dieses Verfahrens ist zu erwarten, daß für eine Reihe diagnostischer Verfahren auf die Notwendigkeit einer vorhergehenden enzymatischen Amplifikation verzichtet werden kann, wodurch z.B. Probleme der Kontamination durch stark verstärkte Einzelsequenzen umgangen werden könnten.

Das Verfahren kann auch anstelle der bekannten diagnostischen Verfahren des RIA, ELISA oder anderer Verfahren eingesetzt werden. Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist darin zu sehen, daß das

System selbstkalibrierend ist. Auf Bestimmungen von Eichkurven oder interne Standardisierung kann verzichtet werden. Jedes Experiment bezieht seine innere Kalibrierung aus der Gesamtzahlbestimmung der betrachteten Moleküle. Beispielsweise haben Schwankungen der Laserintensität keinen Einfluß auf die Meßgenauigkeit. Eine Driftproblematik bei zeitlich aufeinanderfolgenden Messungen tritt nicht in Erscheinung. Messungen sind ohne erneute Kalibrierung zu verschiedenen Zeiten mit gleichem Resultat wiederholbar. Eine Gerätekalibrierung entfällt.

Geladene Moleküle (Kationen und Anionen) lassen sich spezifisch innerhalb des Meßkompartimentes des erfindungsgemäßen Verfahrens durch Einsatz einer "elektrischen Falle" analysieren. Dies kann z.B. dadurch geschehen, daß ein molekularer Fluß durch das Meßkompartiment induziert wird, wobei mit oder ohne Überlagerung durch einen mechanisch induzierten Fluß ein elektrisches Feld für eine Konzentrierung bestimmter ionischer Moleküle im Beobachtungskompartiment sorgt, bzw. ein einzelnes Molekül gerichtet in das Kompartiment transportiert wird. Dies kann sowohl durch ein gleichgerichtetes Feld z.B. zwischen den Austrittsenden zweier Kapillaren mit einer Feldstärke von $1 \mu\text{m}$ erreicht werden. Es gelingt erfindungsgemäß auch, ein oder mehrere eingefangene Moleküle im Beobachtungskompartiment in einem elektrischen Wechselfeld oszillieren zu lassen, sobald es in dieses Volumenelement eingetreten ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist technisch mit einer qualitativ hochwertigen Mikroskopoptik bezüglich der Bildqualität des Fokus realisierbar. Insbesondere das Linsensystem vor dem Austritt des Anregungslichtes muß chromatisch und sphärisch korrigiert sein. Bevorzugt

eingesetzt wird das System Neofluar der Firma Zeiss, Oberkochen, Deutschland, mit hoher Apertur $\geq 1,2$ N.A für den Einsatz mit und ohne Deckglas oder Trennfolie. Der Arbeitsabstand beträgt 0,17-0,9 mm. Das Objektiv ist für Wasser korrigiert und bietet bei maximalem Arbeitsabstand eine maximale Apertur. Ölimmersionsobjektive sind schlecht geeignet. Die Lichtmenge wird erfindungsgemäß durch eine konfokale Lochblende in der Objektebene nach dem Mikroskopobjektiv begrenzt.

Als Laser-Lichtquelle für Wellenlängen von $>200 - 1000\text{nm}$ werden bevorzugt kontinuierliche Laser eingesetzt, insbesondere Laser des Typs Argon, Krypton, Helium-Neon, Helium-Cadmium, und modulierbare Diodenlaser (Rot- bis Infrarot-Bereich) mit der Möglichkeit der jeweiligen Frequenzverdopplung. Patentgemäß ist auch der Einsatz hochfrequent gepulster Laser von ≥ 10 MHz möglich.

Die Laserintensität ist mit 0,5mW bereits so stark das einige Prozent der Farbstoffmoleküle im Beobachtungsvolumen angeregt sind. mit einer Laserintensität von 5mW beträgt der prozentuale Anteil der angeregten Moleküle bereits 50%. Eine weitere Steigerung der Laserleistung erscheint somit für die Steigerung der Lichtausbeute nicht mehr sinnvoll.

Als kopplungsfähige Luminophore bzw. Fluoreszenzfarbstoffe kommen eine große Reihe möglicher Farbstoffgrundstrukturen sowie Oligomere dieser Farbstoffe infrage, wie sie seit langer Zeit für fluoreszenzspektroskopische Nachweisverfahren eingesetzt werden. Bevorzugte Farbstoffe sind solche, die entweder nicht selbst zu spezifischen und interferierenden Wechselwirkungen mit Zielmolekülen beitragen, oder wie in der P 42 34 086.1 (Henco et al.) gezielt unter Ausnutzung spezifischer Bindeeigen-

schaften wie der Fähigkeit zur Nukleinsäure-Doppelstrang-Interkalation eingesetzt werden.

Alle eingesetzten Farbstoffe haben bevorzugt einen Absorptionskoeffizienten zwischen etwa 30.000 und 100.000 bei einer Quantenausbeute von 0,1 - 1.

Bewährt haben sich z.B. Farbstoffe aus der Reihe der Coumarine oder Rhodamin B-Derivate mit hohem Anteil hydrophiler Reste zur Verhinderung hydrophober Wechselwirkungen oder Farbstoffe auf der Basis von Thiazol-orange-Grundstrukturen mit der Fähigkeit der Interkalation in Doppelstränge.

Für das erfindungsgemäße Meßverfahren ist die Resistenz der Farbstoffe gegen die Licht-induzierte Ausbleichung (Bleichstabilität) eine wichtige Eigenschaft. Sie ist allerdings, wie oben erwähnt, nicht mehr von überragender Bedeutung für die Durchführung der Messung, da sich bei dem erfindungsgemäßen Einsatz sehr kleiner Meßvolumina die Meßzeiten um Größenordnungen verkürzt haben gegenüber ca. 40ms in ca. 1000fach größeren Meßkompartimenten.

Die Meßkompartimente müssen gemäß der Abbildung 100 - 1000 μm an das Ausgangsobjektiv der Laser-fokussierenden Optik herangeführt werden. Dies geschieht im einfachsten Falle durch einen am Objektiv selbst hängenden Tropfen, der die zu analysierenden Moleküle enthält. Eine solche Meßanordnung ist nur für wenige Analysen einsetzbar, da hier die Kontaminationsgefahr zwischen verschiedenen Proben groß ist. Einsetzbar sind Techniken vergleichbar denen der konventionellen Mikroskopie mit Deckglas und Ölimmersion. Das erfindungsgemäße Verfahren benutzt Wasserimmersion und sehr dünne Glas- oder Kunststoffolien, um die wäßrige Probe von der Optik zu

trennen. Die Folien können gleichzeitig zum Verschuß der darunterliegenden Kompartimente in Form flächiger Träger oder in Form von Kapillaren dienen.

Für die Anwendung zum Screening großer Probenzahlen, wie sie sich bei Experimenten zur evolutiven Optimierung von Biopolymeren ergeben, werden auch Membranen eingesetzt, die zur Probenseite gerichtet chemisch modifiziert sind. Bevorzugte Modifizierungen sind Oberflächenstrukturen mit spezifischen Bindungseigenschaften wie z.B. Ionenaustauschereigenschaft zur Fixierung von Nukleinsäuren und/oder spezifischen Bindeeigenschaften gegenüber Proteinen wie Antikörperbeschichtung oder die Beschichtung mit Chelatbildnern, insbesondere NTA (Nitrilotriessigsäure) oder IDA (Iminodiessigsäure) zur gezielten Fixierung rekombinanter Proteine oder Peptide mit bindenden Oligopeptiden wie $(\text{His})_6$, die mit hohen Bindungskonstanten ($K_{\text{ass}} \geq 10^{10}$) über Metallchelate an Oberflächen gebunden werden können, um sie auf ihre jeweiligen Wechselwirkungseigenschaften mit Zielstrukturen zu analysieren.

Eine andere Möglichkeit zur beschriebenen Erfassung einzelner Moleküle in kleinen Volumenelementen besteht in dem erfindungsgemäßen Einsatz einer Molekülfalle unter Zuhilfenahme eines elektrischen Feldes, die später beschrieben werden soll. Diese Analyse kann allerdings nur auf ionische Moleküle angewendet werden.

Die Registrierung erfolgt vorzugsweise über die Optik eines Fluoreszenzmikroskopes mit Einzelphotonenzählung, wobei bevorzugt ein Lawinendiodendetektor zum Einsatz kommt. Bewährt hat sich z. B. der Einsatz des SPC-100 und SPC-200 des Herstellers EG & G. Die Signalanalyse erfolgt mit einem digitalen Korrelator oder Vielkanalzähler MCS.

Die Korrelationsmethode gibt direkt Aufschluß über drei charakteristische Molekülgrößen, die Anzahl (N), den Translationsdiffusionskoeffizienten D_t und den Rotationsdiffusionskoeffizienten D_r . Beide sind eine Funktion der Molekülgröße (d.h. Radius, Form und Volumen) und geben Aufschluß über Veränderung des Moleküls durch enzymatische Spaltung oder Komplexierung mit anderen Liganden. Da die Messung der zur Diffusion korrelierten Diffusionszeiten erfindungsgemäß schnell und empfindlich durchgeführt werden kann, läßt sich die Methode zur Analyse der Molekülgrößen und ihrer Verteilung in einer Population in Lösung ohne die Notwendigkeit einer chromatographischen Auftrennung verwenden.

Wie Rigler gezeigt hat, ergibt die Analyse der Korrelationsfunktion für miteinander reagierende Moleküle, daß durch Messung der Molekülzahl N und der Gewichtungsfaktoren der charakteristischen Diffusionszeiten die Wechselwirkung bestimmt werden kann. Für den Fall, daß Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten langsamer als die Diffusionszeit sind, was immer bei spezifischen Reaktionen der Fall sein wird, ist die Korrelationsfunktion durch die Summe der gewichteten Diffusionszeiten gegeben;

$$G(t) = 1 + 1/N(x(1+t/\tau_x)^{-1} + y(1+t/\tau_y)^{-1})$$

wo x, y und τ_x, τ_y der Anteil und Diffusionszeiten von Molekül X und Y sind. $\tau = \omega^2/D$. ω ist der Radius des Probenvolumens und D die Diffusionskonstante.

Für den Fall, daß Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten schneller als die Diffusionszeiten sind, wird die Korrelationsfunktion

$$G(t) = 1 + 1/N(1 + 4\langle D \rangle t / \omega^2)^{-1}$$

wobei $\langle D \rangle = x D_x + y D_y$ ist.

Sind D_x und D_y verschieden, so kann auf einfache Weise ohne molekulare Trennverfahren, wie sie in sog. inhomogenen Assays üblich sind, die Bindung von einem (kleinen) Liganden an ein großes Molekül (Protein, Nukleinsäure, Antikörper) verfolgt werden. Entsprechende Zusammenhänge lassen sich auch für die Rotationsdiffusionskoeffizienten resp. Rotationsdiffusionszeiten ableiten. Die hohe Meßempfindlichkeit übersteigt Radioisotop-Methoden, wie sie aus den Techniken der Radioimmunoassays (RIA) bekannt sind. Diese sind nur bei Markierung mit hoher Radioaktivität gleichwertig. Molekül-Trennverfahren und aufwendige Kalibrierung entfallen bei der erfindungsgemäßen Durchführung. Die Korrelationsmethode stellt somit eine Alternative zum heute verwendeten Radioimmunassay dar. Entsprechend der oben beschriebenen Technik wird anstelle des radioaktiv markierten AntigenReagens ein fluoreszenzmarkiertes Antigen eingesetzt, dessen Bindung an einen Antikörper in homogener Phase oder inhomogener Phase (Festphasen-gekoppelt) in Konkurrenz mit dem zu bestimmenden Antigen analysiert wird. Der Vorteil des Verfahrens beruht im Verzicht auf unerwünschte Radioaktivität bei vergleichbarer Sensitivität.

Dort, wo enzymatische Katalyse zu einer Veränderung der Molekülstruktur und des Molekulargewichtes führt, läßt sich die Entstehung von Reaktionsprodukten über die Veränderung der Molekülzahl und Diffusionszeiten verfolgen. Typische Anwendungen sind Replikation und Spaltung von Nukleinsäuren, Spaltung von Proteinen und Peptiden, aber auch die Selektion katalytischer Antikörper.

Die Möglichkeit, Rotationsdiffusion großer Moleküle in visköser Umgebung durch die FCS-Methode zu messen, ist von besonderer Bedeutung für die Analyse der Dynamik von spezifischen Rezeptoren an der Zelloberfläche aber auch im Zellinneren. Gleichzeitig läßt sich die Bindung markierter Liganden durch Messung von Rotationsdiffusion und Translationsdiffusion an Zellstrukturen, wie Rezeptoren u.a. messen. Beispiele hierfür sind Neurotransmitter, Gewebefaktoren wie Wachstumshormone, aber auch kationische Liganden wie Ca^{2+} .

Die Möglichkeit, Diffusionszeiten in Bruchteilen von Sekunden zu bestimmen, erlaubt die kinetische Wechselwirkung zweier Moleküle mit hohen Assoziationskonstanzen zu analysieren und Rekombinations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten zu bestimmen. Dies ist von besonderem Interesse für die Charakterisierung der Wechselwirkungen hoher biologischer Spezifität, wie Antigen-Antikörper-, Ligand/Rezeptor-Wechselwirkung u.a. Die Analyse besonders langsamer Prozesse mit Konstanten bis 10^{-6} s^{-1} ist ohne weiteres möglich wegen der eingangs erwähnten intrinsischen Methodencharakteristik der Selbstkalibrierung.

Die hohe Empfindlichkeit läßt die Detektion einzelner Moleküle bei ihrer Bewegung durch mindestens einen detektierenden Laserstrahl zu. Durch die Benutzung von sogenannten "Molekültrichtern" in Form von speziellen Glaspipetten mit Öffnungen von $\leq 1 \mu\text{m}$ lassen sich einzelne Moleküle in einen Laserstrahl mit einem Durchmesser zwischen $1-5 \mu\text{m}$ durch Fluß einbringen. Durch die Anwendung von elektrischen Feldern wird die Brown'sche Molekularbewegung so stark eingeeengt, daß jedes Molekül durch das Intensitätsmaximum des Laserstrahls gezogen wird. Die optische Aufstellung mit einander gegenüber

gelegenen Detektoren und Immersionsoptik garantiert sehr guten Photonenfluß und Detektionsgenauigkeit bzw. Detektionseffizienz der in alle Raumrichtungen emittierten Lumineszenz (Abb. 1). Die Anordnung eignet sich zum Beispiel zur Analyse von Sequenzen einzelner DNA oder RNA-Moleküle unter Zuhilfenahme exonukleolytischer Degradation (J.H. Jett et al., US 4,962,037), aber auch zur Erfassung einzelner mit Markierung und Ladung versehener Moleküle.

Einzelne Moleküle lassen sich im Falle ionischer Strukturen auch durch erzwungene gerichtete Translation im elektrischen Feld im Beobachtungsvolumenelement festhalten. Alternativ läßt sich die einmalige oder wiederholte Translation durch das Volumenelement erzwingen. Dies geschieht bevorzugt in einer experimentellen Anordnung, die in Abb. 1 gezeigt ist. Ein Molekülfluß durchläuft ein größeres Probenvolumen in dessen Zentrum sich das erfaßte Beobachtungsvolumen befindet. Durch ein elektrisches Feld, gleichgerichtet oder als Wechselfeld, läßt sich die Wanderung geladener Moleküle durch das Beobachtungselement erzwingen. Diese Molekülfokussierung ist dann von Bedeutung, wenn sich im Gesamtvolumenelement nur ein oder wenige Moleküle befinden, die es quantitativ zu erfassen gilt.

Technisch wird die Aufgabe gelöst, indem bevorzugt das Probenvolumen als Mikrotropfen zwischen den Öffnungen zweier Mikrokapillaren fixiert wird, wie sie von B. Sackmann und E. Neher beschrieben wurden. Die Kapillaren sind mit einer leitfähigen Metallschicht bedampft, bevorzugt Gold auf Chromgrundierung, die an den Öffnungen der Kapillaren mit dem wäßrigen Puffersystem in Kontakt stehen. Das Meßelement befindet sich innerhalb des Probentröpfchens, wobei das Ausgangsobjektiv des

Mikroskops mit dem Tropfen in direktem Kontakt steht oder durch eine Folie von dem Objektiv getrennt ist.

Ist ein einzelnes Molekül oder ein Molekülkomplex nach dem Austritt aus dem Kapillarende einmal im Meßelement erfaßt, lassen sich auch kinetische Daten erhalten. Es ist technisch nicht aufwendig, in dem kleinen Volumenelement einen Feld oder Temperatursprung zu realisieren. Wenn Reaktionskomplexe einen Wien-Effekt zeigen oder eine hinreichende Reaktionsenthalpie aufweisen, lassen sich diese Relaxationsverfahren nutzen, um beispielsweise Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zu bestimmen.

Im Rahmen evolutionärer Screening-Assays ist die Methode zur Bestimmung der Bindung von Liganden an zu selektionierende Moleküle (Eiweiße, Nukleinsäuren, Antikörper) geeignet. Die extreme Empfindlichkeit erlaubt insbesondere die Analyse von hochspezifischen Wechselwirkungen, die von besonderem biologischen Interesse sind. Die Wechselwirkung wird durch Bindung des markierten Liganden oder durch Kompetition des unmarkierten Liganden mit einem markierten Inhibitor gemessen. Somit lassen sich Fitnessbestimmungen an Variantenspektren vor allem bei großen Probenkollektiven durchführen.

Als Fitness-Parameter gelten:

- Affinitätsparameter
- kinetische Parameter
- enzymatische Parameter

unter bestimmten Milieubedingungen des Testes.

Bei der erfindungsgemäßen Analyse und Bewertung großer Probenkollektive phänotypischer Varianten ist es von ent-

scheidender Bedeutung, daß nachfolgend ein Zugriff auf den korrespondierenden Genotyp, z.B. das kodierende Plasmid oder die kodierende mRNA erfolgen kann, um den Evolutionsprozess weiterzuführen. Dieses Problem ist keineswegs trivial. Der Prozess ist umso erfolgreicher, je gezielter der Zugriff erfolgt, das heißt je präziser der entsprechende Genotyp präpariert werden kann, ohne ihn mit Sequenzen zu kontaminieren, die für wertlose Phänotypen kodieren.

Bei mittleren Probenzahlen (<10.000) kann mit voneinander in fester räumlicher Trennung angeordneten Volumenelementen gearbeitet werden, die im folgenden als Küvetten bezeichnet werden. Dies können sowohl Teile eines Folien-systems sein, vergleichbar denen, wie sie für PCT/EP 89/01320, PCT/EP 89/01387, PCT/DE 91/0082, PCT/DE 91/00081, PCT/DE 91/00083, PCT/DE 91/00704 beschrieben worden sind, wobei einzelne Volumenelemente Proben in versiegelten Folienelementen enthalten. Aus den verschlossenen Elementen lassen sich einmal identifizierte Phänotypen gemeinsam mit ihren kodierenden Genen oder mRNA-Transkripten über direkten mechanischen Zugriff isolieren.

Die erfindungsgemäße Methodik der optischen Messung und Variantenbewertung in ultrakleinen Probenvolumina erlaubt auch sehr kleine Probengesamtvolumina in Form einer Mikrokompartimentierung, die jedoch nicht trivial handhabbar sind. Dies gilt sowohl für die individuelle Befüllung als auch für ihre gezielte Entleerung zur Präparation eines als positiv identifizierten Genotyps.

Mikrokompartimente können aus regulären und irregulären porösen Trägern aufgebaut sein wie aus parallel angeordneten Kapillarelelementen, wie sie in der Patentanmeldung P 42 37 383.1 beschrieben sind, oder flächige

Träger aus porösen Materialien wie Glas mit kontrollierten Poren oder Kapillaren, deren Volumenelemente innerhalb der Kapillare eindimensional voneinander separiert sind, jedoch paarweise miteinander in direktem Kontakt stehen.

Eine besonders bevorzugte Form der Mikrokompartimentierung ist in der Abb. 2 dargestellt. Unter einem optisch transparenten flächigen Träger werden die in einer zu analysierenden Probe vorhandenen Volumenelemente in Form rekombinanter oder natürlicher Zellen oder künstlich vesikulärer Elemente mit ihren jeweiligen Phänotypen und Genotypen aufgebracht. Alternativ werden Volumenelemente erst bei dem Auftrag oder nach dem Auftrag auf den Träger generiert. Besonders bevorzugt sind Gel- oder Vesikel-bildende Polymere, insbesondere Polymere auf der Basis thermoreversibler Strukturen wie Caprolactamderivat-Polymere.

Die Auftragung kann zunächst aus homogener Lösung mit nachfolgender Entmischung der Polymere unter Ausbildung getrennter wässriger Volumenelemente erfolgen, oder durch Auftragung in Form mikrodisperser Tropfen mit Hilfe eines piezo-gesteuerten Mikrodispensers.

Auf die beschriebene Weise lassen sich auch die molekularen Inhalte von Zellen analysieren. Beispielsweise lassen sich Zellen in den beschriebenen vesikulären Strukturen einschließen und später bei höheren Temperaturen lysieren. Dabei kommt es zu einer zumindest partiellen Vermischung von vesikulär eingeschlossener Lösung mit ihren reaktionsfähigen Molekülen oder Molekülkomplexen mit dem Inhalt der lysierten Zelle. Reaktionsfähige Moleküle können z.B. Nukleinsäuresonden, Enzyme oder Proteine sein, die mit zellulären Komponenten

spezifische Wechselwirkungen oder Reaktionen eingehen, die mit der erfindungsgemäßen CFS-Methodik nachweisbar und quantifizierbar sind. Diese Technik ist analog zu in situ-Hybridisierungen oder zellspezifischen Proteinfärbungen zu sehen.

Auch Träger zur gleichzeitigen Fixierung von Nukleinsäuren und den zu analysierenden phänotypischen Molekülstrukturen, wie sie in der Anmeldung K.Henco et al., DE 42 37 381.6 beschrieben sind, sind als bevorzugter Reaktionsträger geeignet, um Genotyp/Phänotyp-Kopplung zu erreichen.

Selbstverständlich lassen sich auch Träger einsetzen, wie sie von S. Fodor et al. im Rahmen der sogenannten AFFYMAXTechnologie eingesetzt werden, in der der Genotyp durch die x/y-Position auf dem Träger definiert ist.

Eine bevorzugte Möglichkeit der Adressierung und Kennzeichnung erfindungsgemäß selektierter Varianten in ihren jeweiligen Volumenelementen ist die photooptische Kennzeichnung der Position durch Verwendung der beschriebenen analytischen Optik (Abb. 3). Dies kann durch Einspiegelung von Licht einer Wellenlänge geschehen, mit der eine photoaktivierbare Beschichtung auf der Oberfläche des Trägers angeregt werden kann, um ein leicht erkennbares Reaktionsprodukt zu erzeugen, z.B. durch gezielte Verfärbung. Das Lichtsignal wird aktiviert, wenn die Korrelations-Analyse eine bestimmte vordefinierte Wertigkeit des jeweils analysierten Volumenelementes anzeigt.

Dabei kann eine gängige photoreaktive Beschichtung eingesetzt werden. Als Lichtquelle kann eine zusätzliche Lichtquelle eingesetzt werden, vorzugsweise ebenfalls eine Laserlichtquelle, oder es kann der zur Analyse ein-

gesetzte Laser verwandt werden. Eine Diskriminierung zwischen Messung und Kennzeichnung der Position durch Photoaktivierung kann z.B. durch Einsatz eines Frequenzverdopplers für die Markierungsreaktion erreicht werden.

Nach der Markierung der Positionen auf einem Träger läßt sich aus dem entsprechenden Volumenelement die gewünschte Nukleinsäure entweder durch mechanischen Zugriff gewinnen.

Als erfindungsgemäß besonders geeignet erweist sich anstelle der Markierung des selektierten Volumenelementes gemäß 11) die Markierung des korrespondierenden Genotyps selbst.

Erfindungsgemäß sind mehrere Alternativen bevorzugt:

- (1) die photoaktivierte Anheftung der Nukleinsäuren an Oberflächenstrukturen des Volumenelementes,
- (2) die photochemische Aktivierung Nukleinsäure-spezifischer Liganden,
- (3) photochemische Inaktivierung von Nukleinsäuren in allen Volumenelementen mit Ausnahme der positiv selektierten.

Im Sinne von (1) können beispielsweise Psoralenderivate eingesetzt werden, die als Doppelstrang-interkalierende Reagentien unter 360nm-Lichteinstrahlung Nukleinsäuregegenstränge miteinander verbundunden. Derartige Liganden können entweder beispielsweise chemisch mit der Träger-Oberfläche verknüpft sein (Abb. 4).

Bei der Durchmusterung kann auf diese Weise eine genügende Anzahl Phänotyp-kodierender Plasmidkopien an die positiv selektionierten Oberflächensegmente geheftet werden. Nachfolgend können alle nicht fixierten Nukleinsäuren abgewaschen werden. Sodann können entweder die selektierten Nukleinsäuren an der Oberfläche direkt einer enzymatischen Amplifikationsreaktion unterworfen werden.

Alternativ können die Nukleinsäuren zurückgewonnen werden, indem die Reversibilität der Psoralenverknüpfung ausgenutzt wird. Dies geschieht beispielsweise durch Licht der Wellenlänge von 260 nm. Die Nukleinsäurebindenden Liganden können nach (2) auch mit anderen molekularen Elementen verknüpft werden, die eine nachfolgende Reinigung und Abtrennung von nicht erwünschten Nukleinsäurestrukturen in einfacher Weise ermöglichen. Als Beispiele seien genannt: die Kopplung DNA oder RNA-erkennender Liganden, insbesondere photoaktivierbarer Psoralen-Derivate oder interkalierende Farbstoffe, gekoppelt an Affinitätsliganden, insbesondere Biotin, Avidin, Streptavidin, Immunglobulin, Oligopeptide oder Oligonukleotide.

Gemäß Abb. 4 wird es nach licht-induzierter chemischer Verknüpfung dieser Verbindungen mit der DNA oder RNA aus den positiv selektierten Volumenelementen möglich, die DNA und/oder RNA aller Volumenelemente gemeinsam zu reinigen und gleichzeitig von den Nukleinsäuren zu separieren, die die Selektionskriterien nicht erfüllt haben. Die Abtrennung kann vorzugsweise über hydrophobe Chromatographie, Affinitätschromatographie oder durch den Einsatz magnetischer Partikel erfolgen, wobei die Oberflächen entsprechende Bindeeigenschaften zu dem Liganden des Adaptor-Moleküls aufweisen. Bevorzugte Beispiele für eine derartige spezifische Kopplung sind: oligo-dT/-

oligo-dA, Avidin-Streptavidin/Biotin, NTA-IDA/(His)₆ und ähnliche bekannte Komplex-Bildner.

Die so gepoolten gereinigten Nukleinsäuren können im nachfolgenden Schritt entweder direkt einer enzymatischen Amplifikationsreaktion oder cDNA-Synthese unterworfen werden, oder zuvor durch Reversion der photochemisch induzierten Verknüpfung vom Liganden entkoppelt werden.

Im erfindungsgemäßen Sinne ist es gleichfalls denkbar, gezielt all die Nukleinsäuren zu inaktivieren, die den Selektionskriterien der Analyse nicht genügen (3). Dies kann ebenfalls mit quervernetzenden Substanzen wie Psoralenen geschehen, wobei die Quervernetzung in einer Weise geschieht, daß die so vernetzten Strukturen bei enzymatischen Folgereaktionen nicht mehr amplifikationsfähig sind. Das Verfahren hat allerdings den Nachteil, daß die Inaktivierung sehr vollständig ablaufen muß, da sonst der Anreicherungsfaktor für die positiv selektierten Volumeneinheiten ungünstig beeinflusst wird. Bei den Verfahren (1,2) ist die Ausbeute der Anreicherung nicht von vordringlicher Bedeutung, da mit Hilfe enzymatischer Amplifikationsverfahren auch sehr niedrige Kopienzahlen hinreichend sind. Allerdings ist es für die meisten Anwendungen vorteilhaft, wenn ein möglichst großer Anteil der Nukleinsäuren aus einem positiv selektierten Volumenelement präparativ dargestellt werden kann. Dies gelingt bevorzugt mit einer Optik, die ein größeres Volumenelement als das in der Analyse betrachtete Volumenelement ausleuchtet.

Wie oben bereits ausgeführt, eignet sich das vorgestellte Verfahren insbesondere zur Analyse und Bewertung zahlenmäßig komplexer Kollektive von Molekülen, die zuvor in einem evolutiven Prozeß generiert worden sind. Die

funktionale Analyse komplexer Systeme von molekularer Diversität ist aber auch sonst von erheblicher Bedeutung. Nicht nur aufgrund evolutiver Systeme, im Sinne replikativer Mechanismen, entsteht Diversität, ebenso wenig, wie Kompartimentierung von Subpopulationen nur in zellulären oder vesikulären Strukturen erfolgt.

In der synthetischen Chemie entstehen häufig ungewollt sehr komplexe Systeme verschiedener Molekültypen, wobei sich die Komplexität auch gezielt generieren läßt. Mikroorganismen oder Pflanzen synthetisieren eine Vielzahl Sekundärmetabolite, von denen bereits eine große Anzahl pharmakologisch aktiver Strukturen abgeleitet wurde. Mit chromatographischen Verfahren wie HPLC, FPLC, Gaschromatographie etc. lassen sich solche Verbindungen bekanntlich effizient fraktionieren.

Mit einem derartigen Verfahren erschließt sich somit nicht nur die parallel geführte Analytik von Mutanten/-Varianten aus sogenannten replikativen Systemen wie Nukleinsäuren oder Proteinen, sondern auch chemische oder metabolische Komplexität. Traditionell ist man bislang so verfahren, daß komplexe Gemische zunächst in Einzelfraktionen präparativ aufgereinigt wurden, chemisch nach ihrer Struktur analysiert wurden und wenn möglich in Form der Reinsubstanzen einzeln biologischen Assays zugeführt wurden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gelingt es nun, die zunächst in analytischen Mengen angefallenen Fraktionen präparativ z.B. für pharmakologische Assays einzusetzen. Dabei werden in einem bevorzugten Verfahren die anfallenden Fraktionen direkt mit einem CFS-Assay verknüpft. Es wird darauf verzichtet, Einzelsubstanzen darzustellen, bevor sie nicht positiv in CFS-assays ansprechen.

Die Figur 1 beschreibt die bevorzugte Anordnung der optischen Detektionseinheit in Bezug zum Probenvolumen und Meßvolumen. Ein oder zwei Detektoren (Detektor 1/2) registrieren die emittierten Fluoreszenzsignale aus dem Meßvolumenelement, die ebenfalls über ein oder zwei optische Einheiten, wie sie im Text beschrieben sind, konfokal abgebildet werden. Die wäßrige Probe steht entweder direkt mit der Oberfläche der Austrittslinse in Kontakt oder wird wie in Figur 2 dargestellt durch eine dünne Folie von dem Objektiv getrennt.

Die Probe wird zwischen mindestens zwei Kapillaren mit einer lichten Weite des Kapillarendes von ca. 1 μm gehalten. Die Kapillaren sind im Falle der Funktion als Molekülfalle für ionische Moleküle mit einer leitenden Oberfläche beschichtet, vorzugsweise Gold auf Chrom-Grundierung, an die ein gleichgerichtetes Feld oder ein Wechselfeld angelegt werden kann. Die Steuerung des Feldes geschieht vorzugsweise durch einen Rechner, der mit der optischen Detektionseinheit verknüpft ist und die Felder bei Eintritt eines interessierenden Moleküls in bestimmter Weise regeln kann.

Die Figur 2 beschreibt eine bevorzugte Ausführung der erfindungsgemäßen Anordnung zum Screenen großer Mutantenzahlen nach bestimmten Fitnessparametern ist dargestellt. Unter Verwendung einer optischen Detektionseinheit gemäß Figur 1 befinden sich die Proben in Form von Tröpfchen unter einer folienartigen Oberfläche, die ihrerseits mit dem Objektiv in wäßriger Immersion in Kontakt steht. Die Folie kann bestimmte Beschichtungen tragen, die es erlaubt, gezielt Moleküle aus den jeweiligen Proben an der Oberfläche zu binden. Die Proben können regulär an bestimmten Positionen aufgebracht sein, z.B. durch Verwendung eines Mikrodispensiersystems oder in

statistischer Verteilung. Um ein Verdampfen der Proben zu verhindern, können die Tropfen durch eine schützende Matrix umgeben werden.

Figur 3 zeigt schematisch die CFS-Markierung der selektierten Genotypen. Wenn bestimmte Proben gemäß der Figur 2 vorgewählten Fitness-Parametern entsprechen, kann ein Zugriff auf die jeweiligen Volumensegmente dadurch erleichtert werden, daß die Oberfläche mit einer photoaktivierbaren Beschichtung versehen ist, die z.B. optisch die Position markiert und einen anschließenden Zugriff auf die Probe erlaubt.

Der Zugriff auf ein selektiertes Volumensegment bzw. auf darin enthaltene Moleküle wie kodierende Nukleinsäuren, wie in Figur 4 schematisch gezeigt, läßt sich auch dadurch erreichen, daß lösliche Reaktanden im Volumenelement photoaktiviert werden, um z.B. mit einer Nukleinsäure zu reagieren. Derart markierte Nukleinsäuren lassen sich anschließend relativ einfach isolieren, um sie weiteren Reaktionen zu unterwerfen, beispielsweise einer PCR-Reaktion.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Identifizierung von einem oder wenigen Molekülen, insbesondere in einer Verdünnung von $\leq 10\text{nM}$, durch Verwendung der Laser-angeregten FCS mit Meßzeiten $\leq 500\text{ms}$ bei kurzen Diffusionswegen der zu analysierenden Moleküle, wobei die Messung in kleinen Volumeneinheiten von vorzugsweise $\leq 10^{-14}\text{ l}$ durchgeführt wird, durch Bestimmung stoffspezifischer Parameter, die durch Lumineszenzmessungen an zu untersuchenden Molekülen ermittelt werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei Translationsdiffusionskoeffizienten, Rotationsdiffusionskoeffizienten, die Excitations-, Emissionswellenlänge, die Lebensdauer des jeweils angeregten Zustandes eines lumineszierenden Substituenten oder Kombinationen dieser Meßgrößen als stoffspezifische Parameter bestimmt werden.
3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lumineszenz eines Substituenten mit dem zu bestimmenden Molekül in direkter Wechselwirkung steht, wobei der Substituent ein luminophorer Ligand oder ein Ligandenkomplex ist, dessen spektroskopische Parameter mit der Art oder Funktion des zu bestimmenden Moleküls korreliert sind.
4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei über die Messung der Translationsdiffusion und/oder Rotationsdiffusion mit Auswertung der Korre-

lation die funktionale Bewertung insbesondere durch die Bestimmung der absoluten Zahl vorhandener Moleküle und/oder deren zeitliche Variation und/oder durch die Bestimmung der spezifischen Konzentrationen strukturell unterschiedlicher Liganden und/oder der Ligandenkomplexe und die daraus abzuleitenden thermodynamischen Bindekonstanten spezifischer Wechselwirkungen und/oder die Geschwindigkeitskonstanten spezifischer Erkennungsreaktionen oder enzymatischer Prozesse unter Beteiligung Liganden-gekoppelter Moleküle durchgeführt wird.

5. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die gemessenen Moleküle oder Molekülkomplexe ionischer oder nicht-ionischer Natur sind.
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung in einem überlagerten konstanten oder zeitlich variierenden elektrischen oder magnetischen Feld stattfindet.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei die ionischen Moleküle oder Molekülkomplexe eines Probenvolumen mit Hilfe eines gleichgerichteten elektrischen Feldes oder eines elektrischen Wechselfeldes zum Durchtritt durch das Meßelement und/oder kurzfristigen Verbleib im Meßelement gezwungen werden.
8. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der luminophore Ligand und/oder der luminophore Ligandenkomplex einen Extinktionskoeffizienten ≥ 30.000 bei einer Quantenausbeute $\geq 0,1$ aufweist.

9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßkompartimente in einem Arbeitsabstand von $\leq 1000 \mu\text{m}$ vom Ausgangsobjektiv angeordnet sind, wobei das Objektiv entweder direkt mit dem Probenvolumen in Kontakt steht oder wobei das Probenvolumen durch eine dünne Folie von der Austrittslinse getrennt ist.
10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß definierte Moleküle und/oder Gleichgewichtsgemische von Molekülen und/oder kinetische Reaktionsverläufe in mindestens einem Probenvolumenelement analysiert werden, wobei im Falle mehrerer Probenvolumenelemente diese auf einem flächigen Träger in zweidimensionaler Anordnung, insbesondere einer Membran oder Folie und/oder einer wafer-Oberfläche, oder in linearer Weise, vorzugsweise in einem kapillaren System, angeordnet werden, wobei in bevorzugter Weise die Probenvolumina in oder auf natürlichen oder in vitro modifizierten Zellen und/oder in künstlich hergestellten vesikulären Strukturen vorliegen, insbesondere Vesikel auf Basis von Liposomen oder auf Basis löslicher Polymere mit Vesikel-bildenden Eigenschaften.
11. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Probenvolumina durch Verwendung eines Mikrodispensiersystems generiert werden.
12. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Zugriff auf phänotypisch selektierte Genotypen auf DNA oder RNA-Ebene ermöglicht wird durch photochemische Markierung ent-

sprechender Meßpositionen, indem entweder die lokale Position des zugehörigen Volumenelementes gekennzeichnet wird, vorzugsweise durch Einsatz des zur Phänotyp-Analyse eingesetzten Lasersystems unter Verwendung photochemisch aktivierbarer Substanzen zur optischen Kennzeichnung, oder indem durch photochemisch aktivierbare Reagentien, die in löslicher oder Oberflächen-gebundener Form mit dem Inhalt des selektierten Volumenelementes in Kontakt stehen und mit Strukturelementen des selektierten Genotyps in eine stabile chemische Wechselwirkung treten können, insbesondere durch Psoralenderivate, und über eine spezifische Bindungsreaktion zu einem gekoppelten Strukturelement eine gezielte Abtrennung des selektierten Genotyps ermöglicht, insbesondere aktivierbare Substanzen, die mit Oligonukleotiden oder Biotin oder Avidin oder Streptavidin oder Oligopeptide oder Metallkomplexbildner oder Kombinationen davon verknüpft sind.

13. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, zur Bestimmung der Reaktions-effizienz einer spezifischen Stoffumwandlung oder einer Bindungsreaktion eines Liganden-tragenden Moleküls, indem zu bewertende Volumenelemente simultan oder sequentiell Reaktionsbedingungen ausgesetzt werden und nach definierter Reaktionsdauer eine Analyse der Reaktionsprodukte durchgeführt wird.
14. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13, zur qualitativen und/oder quantitativen Erfassung spezifischer Moleküle und/oder Molekülkomplexe und/oder der molekularen Umgebung der Moleküle und/oder Molekülkomplexe, insbesondere

die Messung und/oder Bewertung physiologisch aktiver Rezeptoren, insbesondere Oberflächenrezeptoren oder die Bewertung Rezeptor-bindender Liganden oder Ligandenkomplexe.

15. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14 als Alternative zu Radioimmunoassays oder Enzymimmunoassays, indem die kompetitive Bindung eines gesuchten Moleküls mit einem Lumino-phor-tragenden Liganden an ein Rezeptormolekül gemessen wird.
16. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15, zur Analyse komplexer Molekül-kollektive wie replikativer Moleküle, insbesondere Nukleinsäuren und davon abgeleitete Proteine oder Peptide, komplexe chemische Reaktionsprodukte, komplexe Systeme von Syntheseprodukten aus chemischen Reaktionen oder komplexe Gemische von Sekundärmetaboliten als zelluläre Syntheseprodukte.
17. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Analyse komplexer Substanzgemische on line mit einer analytischen Fraktionierung erfolgt.
18. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 17 mit einer an sich bekannten Mikroskopoptik für die Laserfokussierung zur Fluoreszenzanregung in einem kleinen Meß-kompartiment ^{$\leq 10^{-14}$} einer sehr verdünnten Lösung und zur Abbildung des emittierten Lichtes in der nachfolgenden Messung durch konfokale Abbildung, wobei mindestens eine Optik hoher numerischer Apertur $\geq 1,2$ N.A. eingesetzt wird, die Lichtmenge durch



eine konfokale angeordnete Lochblende in der Objekt-ebene nach dem Mikroskopobjektiv begrenzt wird und das Meßkompartiment in einem Abstand zwischen 0 und 1000 μm vom Beobachtungsobjektiv entfernt positioniert ist.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß zwei Objektive verwendet werden, die einen Winkel $> 90^\circ$ zueinander bilden.
20. Vorrichtung gemäß Anspruch 18 und/oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß als Lichtquelle kontinuierliche Laser mit emittierenden Wellenlängen $> 200 \text{ nm}$ eingesetzt werden, insbesondere Argon-, Krypton-, Helium-Neon-, Helium-Cadmium-Laser oder hochfrequent gepulste Laser $\geq 20 \text{ MHz}$ mit einer Leistung $\geq 0,5 \text{ mW}$.
21. Vorrichtung gemäß mindestens einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß Einrichtungen für die Einzelphotonenzählung, wie Lawinendiodendetektoren, im Strahlengang des emittierten Lichtes angeordnet sind zur Registrierung des emittierten Lichtes, und wobei die Signalanalyse durch einen digitalen Korrelator oder Vielkanalzähler erfolgt.
22. Vorrichtung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12 und 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Meßkompartiment in einem Probenvolumen zwischen zwei Kapillaren fixiert wird, wobei die Kapillaren auf der Außenseite mit einer chemisch inerten, leitfähigen Beschichtung versehen sind, insbesondere einer Metallbedampfung, insbesondere einer Goldbedampfung auf einem Chromgrund und wobei die leitfähigen Beschichtungen mit einem Rechner-geregelten gleichgerichteten Feld oder einem elektrischen

Wechselfeld verbunden sind und über das Meßkompartiment leitend miteinander verbunden sind.

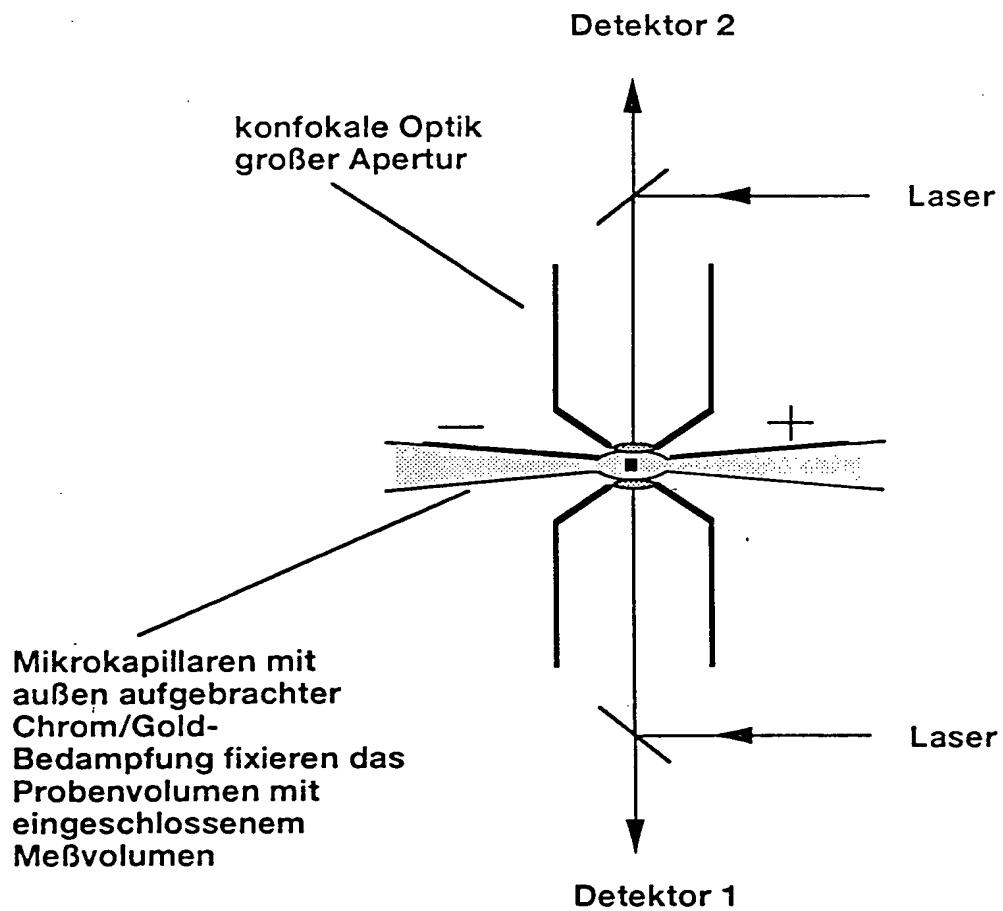
23. Vorrichtung gemäß mindestens einem der Ansprüche 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß zwei einander gegenüberstehende Mikroskopoptiken das Meßkompartiment einschließen.
24. Vorrichtung gemäß mindestens einem der Ansprüche 18 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Folie zur Aufnahme der Proben durch eine molekulare Derivatisierung spezifische Bindungseigenschaften für Moleküle aufweist, insbesondere in Form von Ionenaustauscher-Liganden oder Affinitätsliganden, insbesondere Oligopeptide, Polypeptide, Proteine, Antikörper oder Chelatbildner, insbesondere Iminodisessigsäure- oder Nitrilotriessigsäure-Liganden, insbesondere Folien, die ortsspezifisch unterschiedliche Molekülstrukturen unterschiedlicher Bindungsspezifität als Liganden aufweisen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Verfahren zur Identifizierung von einem oder wenigen Molekülen, insbesondere in einer Verdünnung von $\leq 10\text{nM}$, durch Verwendung der Laser-angeregten FCS mit Meßzeiten $\leq 500\text{ms}$ bei kurzen Diffusionswegen der zu analysierenden Moleküle, wobei die Messung in kleinen Volumeneinheiten von vorzugsweise $\leq 10^{-14}\text{ l}$ durchgeführt wird, durch Bestimmung stoffspezifischer Parameter, die durch Lumineszenzmessungen an zu untersuchenden Molekülen ermittelt werden.

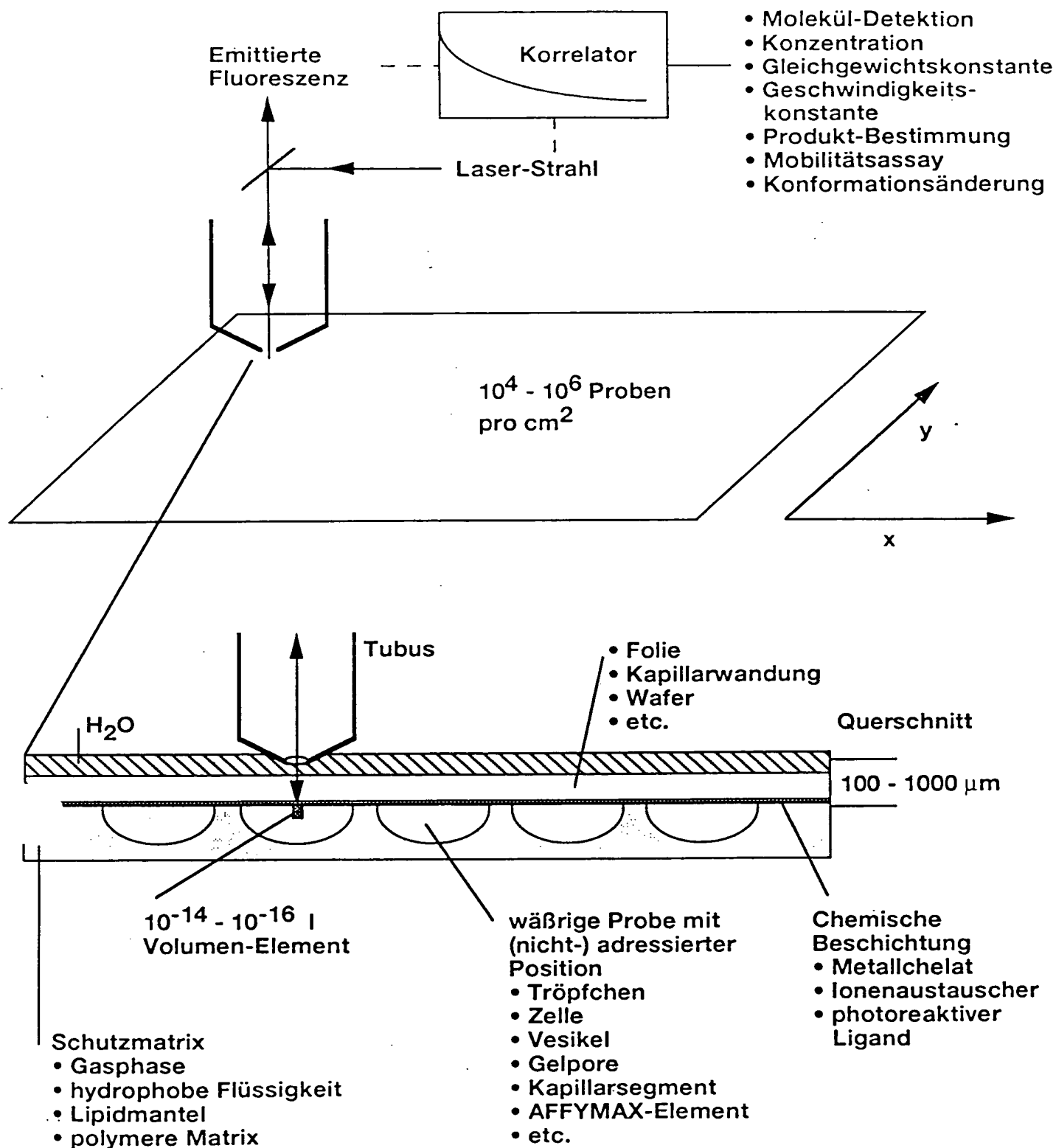
Die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt einsetzbare Vorrichtung ist eine an sich bekannte Mikroskopoptik für die Laserfokussierung zur Fluoreszenzanregung in einem kleinen Meßkompartiment einer sehr verdünnten Lösung und zur Abbildung des emittierten Lichtes in der nachfolgenden Messung durch konfokale Abbildung, wobei mindestens eine Optik hoher numerischer Apertur $\geq 1,2\text{ N.A.}$ eingesetzt wird, die Lichtmenge durch eine konfokale angeordnete Lochblende in der Objektebene nach dem Mikroskopobjektiv begrenzt wird und das Meßkompartiment in einem Abstand zwischen 0 und $1000\text{ }\mu\text{m}$ vom Beobachtungsobjektiv entfernt positioniert ist.

Einzelmolekül-Detektion in der elektrischen Falle



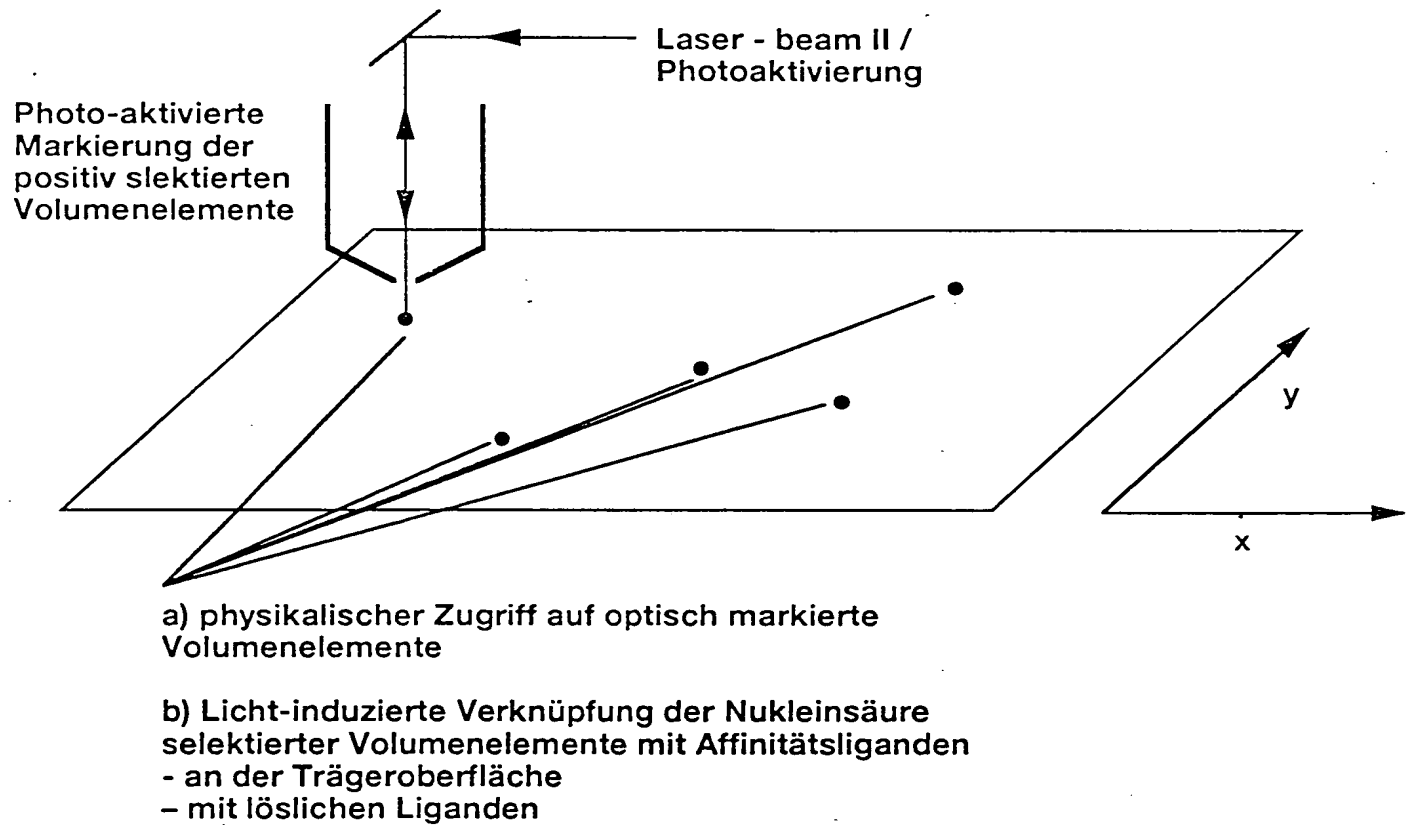
Figur 1

CFS - Fitness Bestimmung von Mutanten



Figur 2

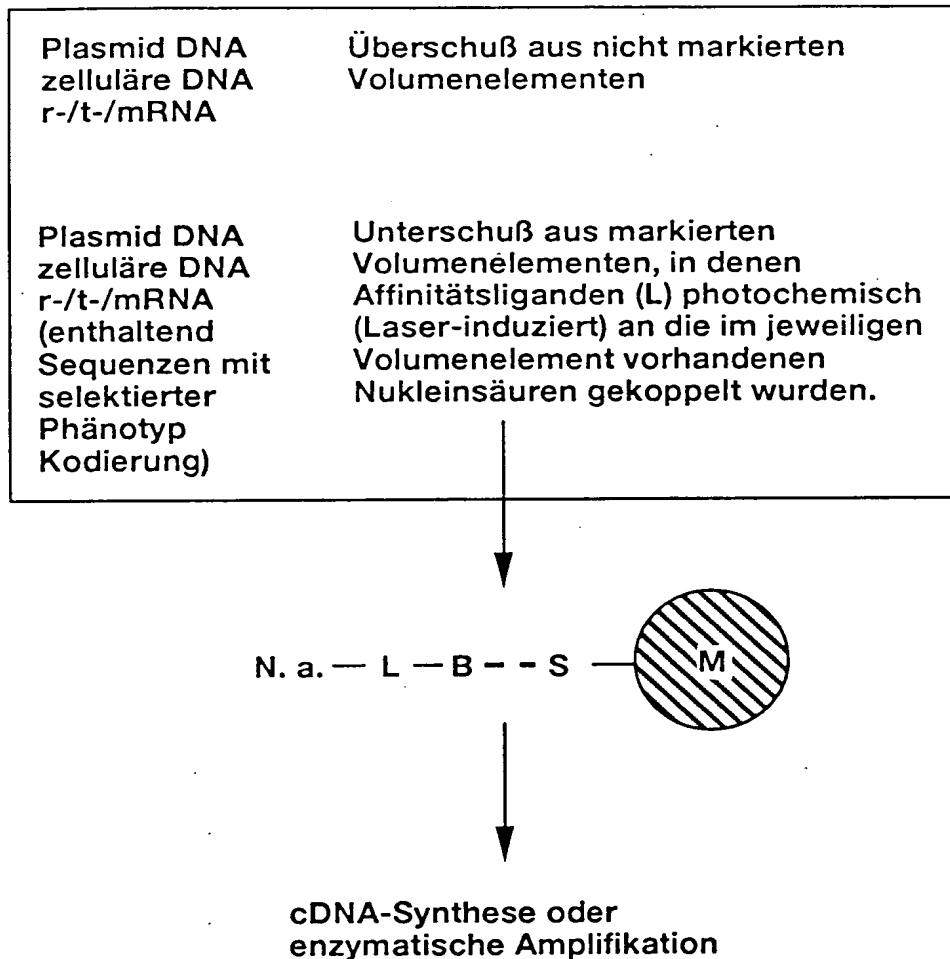
CFS - Markierung der selektierten Genotypen



Figur 3

Präparation der DNA/RNA von CFS-selektierten Genotypen

Gemisch aller Nukleinsäuren nach der Phänotyp-Bewertung:



N. a.; Nukleinsäure.

L; Ligand mit spezifischer Nukleinsäureaffinität, der sich photochemisch kovalent und vorzugsweise reversibel mit einer Nukleinsäure koppeln läßt (z.B. ein Psoralen-Derivat). Der Ligand ist vorzugsweise mit einem Substituenten verknüpft, der die nachfolgende Anreicherung der Nukleinsäuren ermöglicht. Dies können beispielsweise hydrophobe Substituenten sein, um Nukleinsäuren chromatographisch über reversed phase-Chromatographie zu reinigen. Für die Affinitätschromatographie bieten sich Substituenten wie Biotin an (B), so daß sich die Nukleinsäuren über (Strept-)Avidin-Komplexierung (S) mit entsprechend modifizierten Magnetobeads (M) oder Oberflächen anreichern lassen.

Figur 4